

【短報】

細胞内 *Mycobacterium avium* complex に対する clarithromycin と rifampicin の
抗菌活性に及ぼす葛根湯、補中益気湯および十全大補湯の影響

佐藤 勝昌・清水 利朗・佐野 千晶・富岡 治明*

島根大学医学部微生物・免疫学教室

(平成 16 年 7 月 5 日受付・平成 16 年 7 月 23 日受理)

Mycobacterium avium complex (MAC) による感染症は難治性であり、有効な新規抗菌薬や既存の抗菌薬と免疫調節剤との併用などによる治療レジメンの開発が望まれる。今回はそのような治療レジメンの開発を企図して、宿主免疫能を亢進するといわれている葛根湯、補中益気湯あるいは十全大補湯の THP-1 ヒトマクロファージ株 (THP-1 M ϕ) および A-549 ヒト II 型肺胞上皮細胞株内感染 MAC に対する clarithromycin (CAM)/rifampicin (RFP) の抗菌活性発現に及ぼす効果について検討した。その結果、CAM/RFP は THP-1 M ϕ あるいは A-549 細胞内の MAC に対して有意なレベルの殺菌作用を示したが、他方、各漢方薬単独にはそのような殺菌作用のみならず増殖阻害作用も認めなかった。さらに、CAM/RFP に各漢方薬を併用した場合でも CAM/RFP の殺菌作用の増強は認められなかった。

Key words: *Mycobacterium avium* complex, antimicrobial drug, Kakkon-to, Hochu-ekki-to, Juzen-taiho-to

Mycobacterium avium complex (MAC) は isoniazid, ethambutol, pyrazinamide や rifampicin (RFP) などの抗結核薬に対する耐性度が高く、近年開発された clarithromycin (CAM), azithromycin や rifabutin など他の抗結核薬との多剤併用による化学療法は MAC 症にかなり有効であるとはいえず、いまだ菌陰性化には至らない症例や再燃を繰り返す症例が多く治療に難渋しているのが現状である¹⁻⁴⁾。また、現在抗 MAC 活性を有する薬剤が種々開発されつつあるものの、臨床試験に供されているものはほとんどない⁵⁾。したがって、MAC 感染症に対するより有効な化学療法を考えるうえでは、当分の間は既存の抗菌薬による治療効果を免疫調節剤などの adjunctive agent で増強させるような形での治療レジメンの開発に期待せざるを得ないように思われる^{5,6)}。

このような免疫補助剤の candidate の 1 つとして漢方薬が挙げられるが、先にわれわれは rifalazil (RLZ) によるマクロファージ (M ϕ) 内 MAC 菌の殺菌作用は漢方製剤である麻黄附子細辛湯との併用によって有意に増強されること、また実験的マウス MAC 感染症に対する RLZ と麻黄附子細辛湯との併用投与によって、麻黄附子細辛湯は RLZ の治療効果を有意に増強させることを見いだしている⁷⁾。他方、別の漢方薬のヨクイニンにはそうした活性は認められていない⁸⁾。ところで、麻黄附子細辛湯の他に、宿主免疫能を亢進させる薬効を有する漢方薬としては、葛根湯、補中益気湯あるいは十全大補湯などが知ら

れており、このうち、葛根湯は急性熱性疾患に用いられる代表的な漢方薬で、特にかぜ症候群の初期症状に有効であるとされており、その有効性は宿主免疫能の亢進に基づくものと考えられている⁹⁾。また、補中益気湯および十全大補湯は互いに類似した生薬を含有しており、古くから病後・術後あるいは慢性疾患などで全身倦怠感が著しく、顔色不良や食欲不振などの症状がある場合の虚弱体質の改善に有効とされ¹⁰⁾、近年では、これらの漢方薬には、各種細菌、真菌あるいはウイルス感染に対する宿主抵抗性増強作用¹¹⁻¹⁷⁾、さらには抗腫瘍効果なども報告され^{10,18,19)}、免疫調節剤としての機能が注目されている。

今回は、上述の麻黄附子細辛湯について行った検討の対象を葛根湯、補中益気湯および十全大補湯にも広げ、これらの漢方薬の M ϕ 内 MAC 菌に対する CAM/RFP の抗菌活性発現に及ぼす効果について検討した。併せて、結核菌や MAC による肺感染時には、感染菌が最初に接触する宿主細胞としては肺胞 M ϕ のみならず肺胞上皮細胞も重要であると考えられるので²⁰⁾、II 型肺胞上皮細胞に MAC 菌を感染させた系についても同様な検討を行った。

肺 MAC 症患者よりの分離株である MAC N-444 株 (*M. avium* と同定済み) を 7H9 培地中、37 °C で 5 日間培養し、遠心・洗浄後に 1% 牛血清アルブミン (BSA) 含有リン酸緩衝生理食塩液に浮遊させた。次いで、超音波処理によって均等菌浮遊液とした後に -80 °C に保存した。用

Table 1. Effects of the herbal medicines Kakkon-to, Hochu-ekki-to, and Juzen-taiho-to on the antimicrobial activities of CAM/RFP against intramacrophage MAC organisms

Incubation time	Drug and dose ^{a)}	Log CFU/well (Mean \pm SE , n = 3)		
		Kakkon-to	Hochu-ekki-to	Juzen-taiho-to
0-time	None	4.29 \pm 0.09	4.20 \pm 0.10	3.88 \pm 0.02
5-day	None	5.51 \pm 0.04	5.57 \pm 0.03	5.54 \pm 0.05
5-day	CAM/RFP	1.76 \pm 0.03 ^{b)}	2.86 \pm 0.45 ^{b)}	2.81 \pm 0.27 ^{b)}
5-day	1 μ g/mL	5.47 \pm 0.03	5.63 \pm 0.04	5.61 \pm 0.03
5-day	10 μ g/mL	5.50 \pm 0.06	5.68 \pm 0.05	5.52 \pm 0.04
5-day	100 μ g/mL	5.72 \pm 0.02	5.78 \pm 0.01	5.64 \pm 0.03
5-day	CAM/RFP + 1 μ g/mL	1.93 \pm 0.12	2.73 \pm 0.27	2.63 \pm 0.04
5-day	CAM/RFP + 10 μ g/mL	2.25 \pm 0.09	3.09 \pm 0.59	2.64 \pm 0.18
5-day	CAM/RFP + 100 μ g/mL	2.78 \pm 0.80	4.06 \pm 0.22	3.21 \pm 0.36

^{a)} Infected cells were cultured in 5% FBS-RPMI 1640 medium in the presence or absence of CAM/RFP at Cmax doses and/or individual herbal medicines at concentrations of 1 μ g/mL to 100 μ g/mL.

^{b)} Significantly different from 5-day cultures with no drugs, P < 0.05.

Table 2. Effects of the herbal medicines Kakkon-to, Hochu-ekki-to, and Juzen-taiho-to on the antimicrobial activities of CAM/RFP against MAC organisms within A-549 cells

Incubation time	Drug and dose ^{a)}	Log CFU/well (Mean \pm SE , n = 3)		
		Kakkon-to	Hochu-ekki-to	Juzen-taiho-to
0-time	None	4.61 \pm 0.02	4.55 \pm 0.05	4.17 \pm 0.01
5-day	None	5.26 \pm 0.02	5.17 \pm 0.02	5.37 \pm 0.03
5-day	CAM/RFP	2.74 \pm 0.01 ^{b)}	2.99 \pm 0.06 ^{b)}	2.50 \pm 0.05 ^{b)}
5-day	1 μ g/mL	5.16 \pm 0.03	5.06 \pm 0.03	5.19 \pm 0.04
5-day	10 μ g/mL	5.16 \pm 0.03	5.05 \pm 0.02	5.27 \pm 0.04
5-day	100 μ g/mL	5.44 \pm 0.02	5.09 \pm 0.03	5.28 \pm 0.07
5-day	CAM/RFP + 1 μ g/mL	3.03 \pm 0.03	3.18 \pm 0.27	2.65 \pm 0.07
5-day	CAM/RFP + 10 μ g/mL	2.97 \pm 0.06	3.55 \pm 0.49	2.86 \pm 0.35
5-day	CAM/RFP + 100 μ g/mL	3.10 \pm 0.04	3.07 \pm 0.06	2.59 \pm 0.02

^{a)} Infected cells were cultured in 5% FBS-RPMI 1640 medium in the presence or absence of CAM/RFP at Cmax doses and/or individual herbal medicines at concentrations of 1 μ g/mL to 100 μ g/mL.

^{b)} Significantly different from 5-day cultures with no drugs, P < 0.05.

時にこの菌液を溶解し、再度の超音波処理後に実験に供試した。

American Type Culture Collection より入手した THP-1 ヒトマクロファージ株 (THP-1 M ϕ) と A-549 ヒト II 型肺胞上皮細胞株 (A-549 細胞) を 10% 牛胎児血清 (FBS) 加 RPMI 1640 培地中で培養したものを供した。細胞内細菌数の計測は以下のように行ったが、本実験系で得られた値は細胞内菌数を反映したものであることが確かめられている²¹⁾。

すなわち、THP-1 M ϕ については 2,000 units/mL recombinant ヒト IFN- γ (Bender MedSystems, 米国), 100 nM calcitriol (和光純薬) および 1 ng/mL LPS (*E. coli* 0111:B4 γ Difco Laboratories) 含有 10% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させ、その 200 μ L (1 \times 10⁵ cells/well) を平底 96 ウエルへ加え、5% CO₂ 下で 37 $^{\circ}$ C、2 日培養することによって M ϕ へと分化させて供した。次いで、培養液を除去した後に 2% FBS 加ハンクス氏液 (HBSS) で細胞を洗浄し、5% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させた供試菌の 100 μ L (2 \times 10⁶ CFU/well) を加えた。3 時間培養後に 2%

FBS-HBSS で非感染菌を洗浄・除去し、各濃度の漢方薬 (ツムラ) あるいは CAM (2.3 μ g/mL γ アポットジャパン) と RFP (6.2 μ g/mL γ 和光純薬) を含有する 5% FBS-RPMI 1640 培地の 200 μ L を添加して 5 日間にわたって培養した。なお、供試抗菌薬の培地中への添加濃度は臨床投与量を投与した際の血中 Cmax 濃度とした。

A-549 細胞については、5% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させた 200 μ L (4 \times 10⁴ cells/well) を平底 96 ウエルへ加え、5% CO₂ 下で 37 $^{\circ}$ C、18 時間培養した。次いで、培養液を除去した後に 2% FBS-HBSS で細胞を洗浄し、5% FBS-RPMI 1640 培地に浮遊させた供試菌の 100 μ L (8 \times 10⁵ CFU/well) を加えた。4 時間培養後に 2% FBS-HBSS で非感染菌を洗浄・除去し、上述と同様に実験を行った。

いずれの細胞についても、所定日に 0.23% sodium dodecyl sulfate (SDS) の 80 μ L を各ウエルに加えて細胞を溶解した後、これを 20% BSA (120 μ L) で混じることにより SDS を中和させた。次いで、約 10 倍量の蒸留水にて 2 回遠心・洗浄した後に、蒸留水で 10 倍階段希釈を行い、その 10 μ L を 7H11 寒天平板上にスポットし、7 日培

養後にコロニーをカウントすることにより細胞内菌数を計測した。

Table 1 には, THP-1 M ϕ 内局在 MAC に対する CAM/RFP の抗菌活性に及ぼす各漢方薬(葛根湯, 補中益気湯, 十全大補湯)の添加効果について示した。Table 1 より明かなように, CAM/RFP 単独では M ϕ 内の MAC に対して有意なレベルの殺菌能が認められたが, 他方, いずれの漢方薬ともそれら単独では M ϕ 内での MAC 菌の増殖を阻害する傾向はみられなかった。さらに, 各漢方薬を CAM/RFP と併用した場合にも, CAM/RFP による殺菌能をさらに増強させるような効果は認められなかった。これらのことは, 今回供試した 3 種の漢方薬は, 麻黄附子細辛湯の場合⁷⁾とは異なり, 単独または CAM/RFP との併用添加の系でも, MAC 菌の M ϕ 内での挙動には特に影響を及ぼさないことを示している。しかしながら, 別の実験でペプトン誘導マウス腹腔細胞をこれら漢方薬で 3 日間処理した後, 非付着細胞を洗浄・除去した後に得られたマウス腹腔 M ϕ に MAC を感染させ, その後 CAM/RFP 存在下で培養したところ, 漢方薬処理 M ϕ では CAM/RFP の MAC 殺菌能が増強されるといった現象が認められている(論文作成中)。このことは, これら漢方薬は M ϕ 自体にはその抗菌力を増強させるような活性化作用は発揮し得ないものの, リンパ球の活性化を介して M ϕ 殺菌能を up regulate するような免疫調節作用を示し得るといった可能性を示している。このことから, *in vivo* での MAC 感染に対する CAM/RFP の治療効果はこれらの漢方薬の併用投与によってある程度は増強される可能性が考えられるが, この点については今後の検討に待ちたい。

先にわれわれは, ①結核菌や MAC は生体内の II 型肺胞上皮細胞内へ侵入し, そこを一時的な増殖の場に行っていること, ②結核菌あるいは MAC 感染 II 型肺胞上皮細胞は, TNF- α と GM-CSF の産生増強を介して, M ϕ の抗菌活性を up regulate し, さらに MCP-1 や IL-8 の産生増強を介して, 種々の炎症性細胞を感染局所へ集積させることにより, 宿主感染抵抗性を亢進させていることを報告した²⁰⁾。Table 2 に示したように, 先の THP-1 M ϕ における場合と同様に, CAM/RFP 単独では A-549 細胞内の MAC に対して有意なレベルの殺菌能が認められたが, 他方, 葛根湯, 補中益気湯や十全大補湯はいずれもそれら単独では A-549 細胞内 MAC 菌の増殖を阻害するような傾向はみられず, さらに各漢方薬を CAM/RFP と併用した場合, CAM/RFP による殺菌能をさらに増強させるような効果も認められなかった。しかしながら, これらの漢方薬を生体へ投与した場合, II 型肺胞上皮細胞からのサイトカインなどの産生増強を介して M ϕ の抗菌活性を亢進させる可能性が残っており, この点については今後の検討に待ちたい。

以上の成績より, CAM/RFP は供試細胞内の MAC に対

して有意なレベルの殺菌作用を示すが, 各漢方薬単独にはそのような殺菌作用のみならず増殖阻害作用も認め得ないこと, また CAM/RFP に各漢方薬を併用した場合でも CAM/RFP の殺菌作用の増強は認められないことがわかった。このように, 今回の成績は, 漢方薬の中には麻黄附子細辛湯のような M ϕ の抗 MAC 活性を直接増強する薬効を有するものから⁷⁾, そうした作用を示さない葛根湯, 補中益気湯, 十全大補湯およびヨクイニン⁸⁾などさまざまであることを示唆しているが, 今後さらに多くの漢方薬について検討を進める予定である。

謝 辞

供試薬剤を分与いただいたアポットジャパン株式会社ならびに株式会社ツムラに深謝します。

文 献

- 1) Inderlied C B, Kemper C A, Bermudez L E: The *Mycobacterium avium* complex. Clin Microbiol Rev 6: 266 ~ 310, 1993
- 2) Tomioka H: Prospects for development of new antimycobacterial drugs. J Infect Chemother 6: 8 ~ 20, 2000
- 3) Benson C A: Disseminated *Mycobacterium avium* complex infection: implications of recent clinical trials on prophylaxis and treatment. AIDS Clin Rev 98: 271 ~ 287, 1997
- 4) 富岡治明: 非結核性抗酸菌の分類と細菌学的特徴。呼吸と循環 52: 565 ~ 574, 2004
- 5) 富岡治明: 新しい抗結核薬開発の展望。結核 77: 573 ~ 584, 2002
- 6) Tomioka H: Adjunctive immunotherapy of mycobacterial infections. Curr Pharm Design 2004. in press
- 7) Shimizu T, Tomioka H, Sato K, et al: Effect of the Chinese traditional medicine Mao-bushi-saishin-to on therapeutic efficacy of a new benzoxazinorifamycin, KRM-1648, against *Mycobacterium avium* infection in mice. Antimicrob Agent Chemother 43: 514 ~ 519, 1999
- 8) Shimizu T, Tomioka H, Sato K, et al: Effects of Yokuinin on the therapeutic efficacy of a new benzoxazinorifamycin KRM-1648 against *Mycobacterium avium* complex. Int J Antimicrob Agents 11: 69 ~ 74, 1999
- 9) 村岡健一, 吉田 哲, 長谷川和正, 他: 葛根湯製剤の作用機序の薬理的検討 イヌによる体温上昇と免疫能活性について。J Trad Med 20: 30 ~ 37, 2003
- 10) 済木育夫: 漢方薬の抗腫瘍効果とその作用機序。医学のあゆみ 202: 205 ~ 209, 2002
- 11) 草地信也, 炭山嘉伸, 長尾二郎, 他: MRSA 除菌方法の検討 創の処置と補中益気湯投与について。Prog Med 21: 1360 ~ 1361, 2001
- 12) 安部 茂, 石橋弘子, 丹羽 茂, 他: 各種漢方補剤の経口投与による *Candida* 感染マウスの延命効果。日医真菌会誌 41: 115 ~ 119, 2000
- 13) Shigehito N: Effect of Hochu-ekki-to on asymptomatic MRSA bacteriuria. J Infect Chemother 9: 58 ~ 61, 2003
- 14) 川喜多卓也, 野本亀久雄: 補中益気湯の免疫薬理作用とその臨床応用。Prog Med 18: 801 ~ 807, 1998
- 15) 德里夏提依米提, 李 愛麗, 大川尚子, 他: 経口免疫

- 調節剤による *Helicobacter pylori* への直接作用及び白血球への量的・質的影響。Bacter Adhere Biofilm 15: 139 ~ 144, 2001
- 16) Abe S, Tansho S, Ishibashi H, et al: Protection of immunosuppressed mice from lethal *Candida* infection by oral administration of a kampo medicine, Hochu-ekki-to. Immunopharmacol Immunotoxicol 21: 331 ~ 342, 1999
- 17) 木戸敏孝, 石毛 敦, 佐々木博: 補中益気湯の免疫調節作用とウイルス感染に対する効果。漢方と免疫・アレルギー 15: 10 ~ 20, 2001
- 18) 河野 寛, 浅川真巳, 牧 章, 他: 肝細胞癌発癌抑制を目的とした十全大補湯による Kupffer 細胞の活性化抑制と抗腫瘍免疫能活性化。Prog Med 23: 1556 ~ 1557, 2003
- 19) Utsuyama M, Seidler H, Kitagawa M, et al: Immunological restoration and anti-tumor effect by Japanese herbal medicine in aged mice. Mech Aging Dev 122: 341 ~ 352, 2001
- 20) Sato K, Tomioka H, Shimizu T, et al: Type II alveolar cells play roles in macrophage-mediated host innate resistance to pulmonary mycobacterial infections by producing proinflammatory cytokines. J Infect Dis 185: 1139 ~ 1147, 2002
- 21) 佐藤勝昌, 小笠原圭子, 赤木竜也, 他: マクロファージおよび II 型肺胞上皮細胞内の結核菌あるいは *Mycobacterium avium* complex に対する各種薬剤の抗菌効果。結核 74: 571 ~ 577, 1999

Effects of the Chinese traditional medicines Kakkon-to, Hochu-ekki-to, and Juzen-taiho-to on the antimicrobial activity of clarithromycin in combination with rifampicin against *Mycobacterium avium* complex within THP-1 human macrophages and A-549 human type II alveolar epithelial cells

Katsumasa Sato, Toshiaki Shimizu, Chiaki Sano and Haruaki Tomioka

Department of Microbiology and Immunology, Shimane University School of Medicine, Izumo, Shimane, Japan

Since *Mycobacterium avium* complex (MAC) infections are very refractory, the development of new drugs with strong anti-MAC activity or therapeutic regimens using ordinary antimycobacterial drugs in combination with immunomodulators is urgently desired. In this study, we studied the effects of the Chinese traditional medicines Kakkon-to, Hochu-ekki-to, and Juzen-taiho-to, which exhibit immunopotentiating activity, on the antimicrobial activity of clarithromycin (CAM) in combination with rifampicin (RFP) against MAC organisms replicating within THP-1 human macrophage ($M\phi$) and A-549 human type II alveolar epithelial cell lines. When MAC-infected cells were cultured for 5 days in a 5% FBS-RPMI 1640 medium in the presence or absence of CAM/RFP at Cmax doses (CAM, 2.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$; RFP, 6.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) with or without the Chinese herbal medicines at concentrations of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAM/RFP significantly eliminated the intracellular organisms within THP-1 $M\phi$ s and A-549 cells. The Chinese traditional medicines, however, failed to inhibit intracellular bacterial growth. Moreover, these herbal medicines did not potentiate the activity of CAM/RFP against intracellular MAC organisms.